动 物 学 研 究 1995, 16（3）：263—270　　CN 53-1040／Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research

不同产地中华马氏钳蝎神经毒素的分离纯化和部分性质比较研究*

刘延顺　王　森　金　雷　李宏民　王大成**
（中国科学院生物物理研究所　北京　100101）

摘要　经 Sephadex G-50, Sp-Sephadex C-25 两次柱层析，从不同产地的东亚马氏钳蝎（*Buthus martensi* Karsch）粗毒中分别得到了一组碱性哺乳动物神经毒素和一种甲壳类神经毒素，对它们进行的等电点、分子量、动物毒性等部分性质的研究与比较结果表明，浙川、常德与益都产的蝎毒无论在柱层析行为上，还是在等电点、分子量、各组分的毒性大小顺序及某些对应组分的结晶行为上有很大相似性，仅存在略微的差异。

关键词　蝎毒，神经毒素，纯化，比较

已知蝎毒液中的主要有效成份是一组作用于钠、钾离子通道的神经毒素。蝎神经毒素由一个小分子碱性蛋白家族组成(Zell 等，1985)，它们显示出明显的序列同源性，然而毒性及作用专一性却有很大的差别，因此是研究生物大分子结构与功能的好材料。同时研究蝎神经毒素结构与功能的关系对了解离子通道作用机理，生物膜中受体与配体相互作用及蝎毒作为降血压、抗癫痫、抗惊厥传统中药的药理作用有重要意义。目前已知不同种属蝎神经毒素间差异较大，它们往往各自自成体系。关于中华马氏钳蝎（*Buthus martensi* Karsch，以下简称 BmK）毒素的分离纯化及部分序列的研究虽有一些报道（王锦兰等，1985；吉永华等，1983；胡纫秋等，1989；刘建宁等，1988），但已报道的方法都不能提供批量纯化并保有活性的样品，因此难以适应晶体结构、NMR 结构这样一些深入研究的需求。特别是蝎的种属变化较大，蝎毒组分复杂，进一步深入研究要求有清晰的生化基础，而以往的报道中所用的蝎毒的产地不同，各自分离方法不同，各自编号也不同，结果难以比较、关联。对同一种属来自不同产地的蝎神经毒素间的比较尚未见报道。其基本成份是否相同?在分子水平上是否具有共同性?这是在结果比较时常遇到的问题。为此我们选择了来自山东、湖南、河南、四川的蝎毒粗品，用我们实验室建立的蝎神经毒素活性样品批量纯化的可靠方法，在相同条件下对它们进行了分离纯化和部分生化性质及生物学性质测定，在此基础上进行了比较研究，并在它们的纯化组分间建立了联系。这对深入了解我国的蝎毒资源也有重要意义。本文主要报道分离纯化及比较研究结果，以此为基础的

* 国家自然科学基金资助项目

** 通信联系人

本文 1994 年 6 月 6 日收到，1995 年 4 月 20 日修回

晶体学研究结果将另文报道。

1 材料和方法

1.1 蝎毒

从尾部毒腺中所得的毒液经低温真空干燥后得粗毒干粉。湖南常德、河南淅川、四川成都的粗毒分别由当地药材采购站提供，用电刺激方法获得，前者为米黄色颗粒，后二者为白色粉末。山东益都粗毒由本实验室用剪尾法亲自采得，冻干后为白色絮状固体。

1.2 试剂

Sephadex G-50, Sephadex G-25, Sp-Sephadex C-25, 多肽分子量标准盒(MW2560-17200)，等电点标准盒(PI3-10)系 Pharmacia 公司产品，丙烯酰胺系 IBI 公司产品，TEMED、溴酚蓝、过硫酸铵系 Bio-Rad 公司产品，Ampholine 系 LKB 公司产品，甲叉双丙烯酰胺系 SERVER 产品，SDS 系 Sigma 产品，其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 纯化流程

在文献报道的方法(胡纫秋等，1989)的基础上，加以适当改进，采用 LKB 柱层析仪进行，详见图 1。

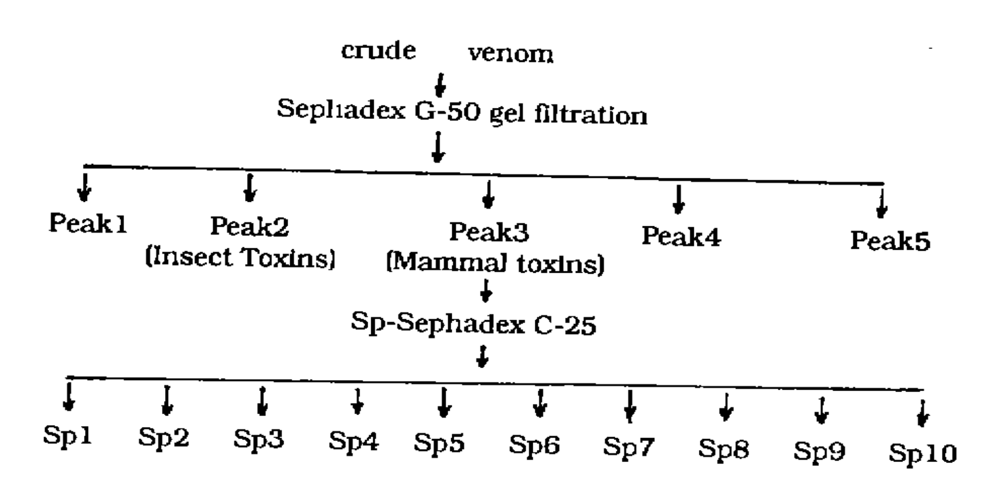


图 1 东亚马氏钳蝎毒素纯化流程图

Fig . 1 Purification of scorpion venom from *Buthus martensi* Karsch

1.4 部分性质的研究

1.4.1 等电点测定 按文献上的方法(郭尧君，1988)，用 0.4 mm 厚的聚丙烯酰胺凝胶，在 LKB 公司的 Multiphor2117 电泳仪上进行 pH 3—10 范围的超薄层水平板等电聚焦电泳。由于蝎毒是小分子蛋白，为防止用 TCA 固定后在染色过程中的再溶解，采用小肽染色法(Righetti 等，1978)染色。采用 Pharmacia 公司等电点标准盒的 pI3—10 的 Marker，作出标准曲线，从标准曲线上求出未知蛋白的等电点。

1.4.2 分子量测定 按文献上的方法(郭尧君，1991)，用 8%—25%的梯度胶，在

Pharmacia 公司的 Phast System 电泳仪上进行 SDS 孔径梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳。用 Pharmacia 公司多肽分子量标准盒为 Marker，以分子量的对数对 Marker 的相对迁移率作出分子量标准曲线，由标准曲线确定未知蛋白的分子量范围。

1.5 毒性试验

1.5.1 哺乳动物毒性试验 以 18—20 g 雌雄混合的小白鼠为试验动物，进行尾部静脉注射，以注射生理盐水为对照，观察 1 h 内急性死亡及 24 h 内死亡情况。注射毒液后小鼠一般表现出四肢瘫痪，呼吸急促，尾巴僵直，失去平衡，口眼分泌物增多等症状。若 1 h 内不死亡，一般几小时后可恢复。

1.5.2 昆虫毒性试验 在自养的雄性美洲蜚蠊(*Periplaneta americana*)成虫第 4、5 腹板交接处进行腹腔注射，以注射蒸馏水为对照，观察 1 h 内急性死亡及 24 h 内死亡情况。注射后蜚蠊会出现强直麻痹反应，有鼓翅，爬行蹒跚，足部抖动等中毒症状。

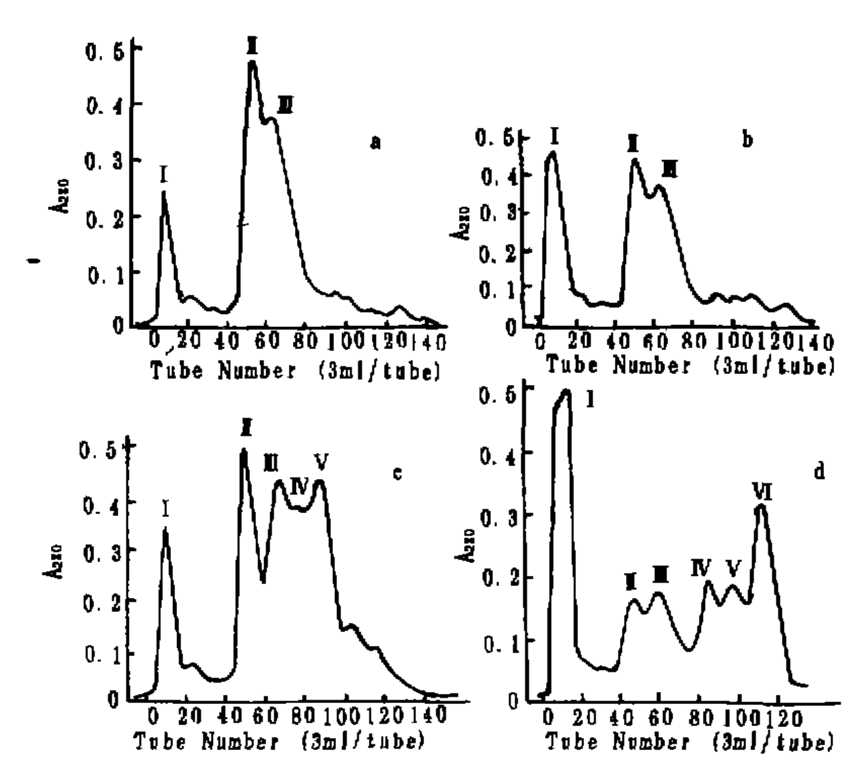


图 2 4 个不同产地马氏钳毒素 Sephadex G-50 柱层析图谱

Fig. 2 Gel filtration chromatography of crude scorpion venom from *Buthus martensi* Karsch from four places on Sephadex G-50 colum (2.0 × 150 cm)

eluent: 0.05 mol / L NH_4HCO_3(pH8.0) Flow rate: 3 ml / 10 min

a. from Xichuan, Henan Province b. from Changde, Hunan Province

c. from Chengdu, Sichuan Province d. from Yidu, Shandong Province

1.5.3 甲壳动物毒性试验 用 30—38 g 克氏原喇蛄(*Procambarus clarkii*)作试验动物进行背部胸腹节之间注射，观察出现强直麻痹反应及 1 h 内死亡情况，作为对甲壳动物毒性

的指标。

2 实验结果

2.1 神经毒素种类

经 Sephadex G-50 柱分离所得的 4 个产地的蝎神经毒素的层析图谱见图 2。对 3 种主要成分(Ⅰ，Ⅱ、Ⅲ)进行了毒性试验，结果列于表 1。在各层析组分中，峰Ⅰ无毒性，峰Ⅱ均含有昆虫毒素，峰Ⅲ均含有哺乳动物神经毒素，这是其基本的共同点。比较洗脱图谱，淅川、益都、常德的结果非常相似，只是益都图谱中Ⅰ峰含量很高，这可能与其采用剪尾法而其它 3 个产地采用电刺激法采毒有关。而成都图谱与前 3 个产地的图谱有较大差别(图 2)。同时，成都产毒素的图谱中有 5 个主峰，山东产毒素的图谱中 6 个主峰，其它两个产地的毒素图谱中仅有 3 个主峰。此外，常德与淅川毒素中的Ⅱ与Ⅲ峰重叠很大。这些情况说明 G-50 层析结果显示 4 个不同产地的毒素有基本的相似性，但也可能含有各自的特有组分。从表 1 毒性试验结果可以看出，4 个不同产地的蝎毒中含有类型基本相同的神经毒素。(由于成都粗毒量太少，不足以继续研究，因此以下的分析比较只用 3 个产地的蝎毒)。

表 1 粗毒 Sephadex G-50 柱层析各主要组分的毒性

Tab. 1 Toxicity of main fractions from Sephadex G-50 chromatography

蝎毒产地		淅川			常德			成都			益都		
组份		XⅠ	XⅡ	XⅢ	CⅠ	CⅡ	CⅢ	SⅠ	SⅡ	SⅢ	YⅠ	YⅡ	YⅢ
毒性(μg/g)	小白鼠	-	-	1.3	-	-	1.2	-	-	2.4	-	-	1.6
	蝲蛄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	蜚蠊	-	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-	+++	+

2.2 哺乳动物神经毒素的等电点与分子量

各取淅川、常德和益都蝎毒的 G-50Ⅲ峰分别经 Sp-Sephadex C-25 进一步纯化，分别得到一组毒性不同的哺乳动物神经毒素，结果见表 3。淅川与常德的图谱在峰形，峰的位置及各组分的含量上都极其相似，而与益都图谱略有差别，但它们的多数峰基本上还是相对应的。这可能与淅川、常德蝎毒的Ⅱ、Ⅲ峰重叠较大，而益都蝎毒的 G-50 的Ⅱ、Ⅲ峰分离较好有关。

取淅川、常德和益都毒素经 Sp-Sephadex C-25 的纯化组分进行 IEF-PAGE 及 SDSPAGE 分析，所測得各组分的等电点和分子量分别列于表 2 和表 3。从这些结果可以看出淅川和常德蝎毒的离子交换柱纯化组分基本上是相对应的，仅 CSP5 对应于淅川中的组分因分离效果较好而分裂成两个峰。它们对应组分的等电点及分子量在误差范围内是相等的。将等电点测量结果与离子交换柱层析图谱综合起来可以清楚地看出益都 YSp3，4，5，6，8，9，10 分别对应于 CSp2，3，4，5，8，9，10，这些对应的组分之间的等电点也基本上是相等的。同样，从 SDS-PAGE 结果来看，益都、淅川和常德的各组分的分子量都处于 6000—8000 之间，与过去报道的结果(胡纫秋等，1989)是一致的。至于它们是否为完全相同组分侧有待于用氨基酸测序，分子结构解析等进一步鉴定，目前这些工作

正在进行中。

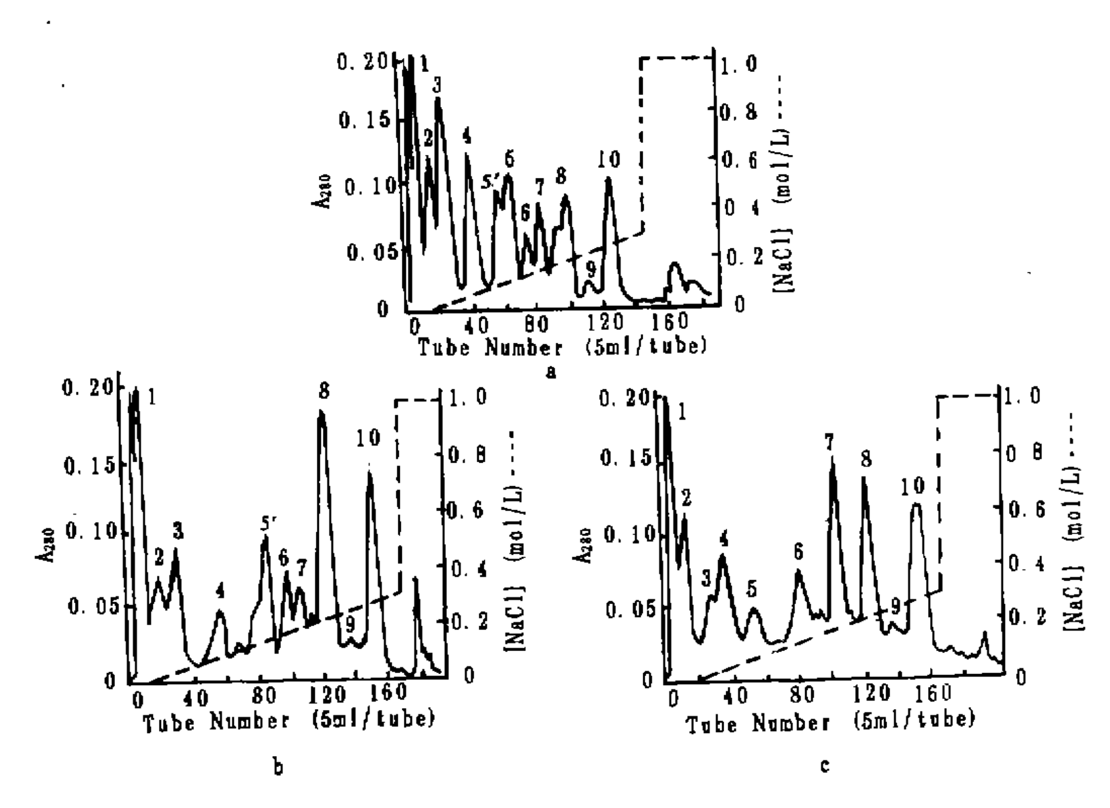


图3 Sephadex G-50 峰Ⅲ在 Sp-Sphadex C-25 柱上的层析图谱

Fig. 3 Ion exchange chromatography of fraction 3 from Sephadex G-50 on Sp-Sephadex C-25 column (1.5 × 40 cm)

eluent: 0.1mol / L phosphate buffer(pH6.0) with salt gradient (0-0.3-1.0 mol / L NaCl)

flow rate: 5 ml / 10 min a. from Xichuan, Henan province

b. from Changde, Hunan Province c. from Yidu, Shandong Province

表2 淅川、常德、益都蝎毒各纯化组分的等电点

Tab. 2 The isoelectric points of purified scorpion toxins

组份	Sp-1	Sp-2	Sp-3	Sp-4	Sp-5	Sp-5′	Sp-6	Sp-7	Sp-8	Sp-9	Sp-10
淅川	7.54	* *	9.00	9.32	8.30*	8.80*	9.64	>10	9.30*	9.66*	9.48
常德	7.54	* *	9.02	9.35	9.25*	(8.38)	9.64	>10	9.28*	9.66*	9.44
益都	7.48	6.78*	* *	8.90	9.36	(9.00*)	8.90	8.92*	9.25*	9.58	9.40

"*" shows the main component in this fraction

"* *" the sample is indissolutable in distilled water

2.3 毒性

淅川、常德和益都蝎毒的 Sp-Sephadex C-25 纯化各组分的毒性分别列于表 4 和表 5。从表中可见，淅川的 BmK 有 7 个哺乳毒，常德和益都的 BmK 都各有 6 个，淅川与

常德各组分的哺乳动物毒性及昆虫毒性基本上相对应，而从离子交换洗脱图谱上看，YSp6对应于CSp5及XSp5、XSp5′，因此益都各洗脱组分的哺乳毒性与常德及淅川基本上也是相对应的，仅个别组分略有差异，在淅川、益都及常德蝎毒中均发现了甲壳类毒素(CT)。

表3 淅川、常德、益都蝎毒各纯化组分的分子量

Tab. 3 The molecular weight of purified scorpion toxins

组份	Sp-1	Sp-2	Sp-3	Sp-4	Sp-5	Sp-5′	Sp-6	Sp-7	Sp-8	Sp-9	Sp-10
淅川	6760	7150	7860	7650	7600	7600	7150	7340	8160	8170	6920
常德	6790	7150	7910	7620	7620	-	7150	7350	8130	8130	6950
益都	6810	7120	7120	7900	7690	-	7710	7690	7980	8020	6950

表4 各纯化组分的哺乳动物毒性及甲壳类毒性

Tab. 4 The mammal toxicity and cambarus toxicity of purified fractions

	毒素	BmK1	BmK2	BmK3	BmK4	BmK5	BmK6	CT
常德	组份	Csp10	Csp5	Csp3	Csp8	Csp9	Csp7	Csp9
	毒性(μg/g)*	0.5	0.5	1.1	2.3	5.6	9.6	0.55
淅川	组份	Xsp10	Xsp5′Xsp5	Xsp3	Xsp8	Xsp9	Xsp7	Xsp9
	毒性(μg/g)*	0.8	1.0	1.1	2.3	4.3	5.3	0.91
益都	组份	Ysp10	Ysp6	Ysp7	Ysp8	Ysp9	Ysp2	Ysp9
	毒性(μg/g)*	0.5	0.98	2.0	3.9	5.8	4.4	0.95

BmK指哺乳动物毒素；*CT*指甲壳类毒素；注射剂量大于10 μg/g小白鼠的组分被认为没有毒性。(BmK refers to mammal toxins。CT refers to cambarus toxins. Those fractions which have no reaction on mouse when a dose more than 10 μg/g mouse is injected are regarded as no toxicity).

表5 各纯化组分的昆虫毒性

Tab. 5 Insect toxicity of purified fractions

组份	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6	Sp7	Sp8	Sp9	Sp10
淅川	-	-	-	-	++	-	-	-	+	+++
常德	-	-	-	-	+	-	-	-	+++	+++

"+++"指注入4—6 μg/g的剂量可观察到中毒症状(toxic symptom were observed when a dose of 4—6μg/g had been injected)；

"++"指注入6—8 μg/g的剂量可观察到中毒症状(toxic symptoms were observed when a dose of 6—8 μg/g had been injected)；

"+"指注入8—10 μg/g的剂量可观察到中毒症状(toxic symptoms were observed when a dose of 8—10 μg/g had been injected)；

"-"指注入大于10 μg/g的剂量而无中毒症状(no reaction was observed when a dose more than 10 μg/g had been injected)。

2.4 结晶行为

运用本文报道的方法所获得的纯化样品在单晶培养上已取得重大突破，在晶体培养过程中，XSp8 与 CSp8，XSp10 与 CSp10 表现出基本相同的结晶行为，相对应的组份在相同的条件下得到了晶型相同的晶体。其它组份的晶体生长正在进行中。

3 讨论

3.1 样品的分离纯化对晶体生长至关重要，高质量晶体的获得离不开优质样品的制备。本文报道的分离纯化方法与过去的方法相比有两个明显的改进：该方法可批量提供纯化样品，且该方法可得到多个单一纯且有高活性的组分。对于那些不纯的组分经制备等电聚焦电泳进一步纯化，所得的高纯度组分明显改善了其结晶行为。可见晶体学的突破必须有良好的生化基础。这从另一个方面体现了本文报道的纯化方法的意义所在。

3.2 毒性试验可以看出 G-50 峰Ⅲ中含有昆虫毒性，这可能因峰Ⅱ，峰Ⅲ有较大的重叠而造成。但某些组分如 XSp10，CSp10 既有 MT 和 IT，又对甲壳类有强直麻痹作用，且 XSp10 电泳显示为单一纯，这是一个很令人感兴趣的组分。关于其结构研究正在进行中。

3.3 生物大分子的晶体生长对样品及生长条件要求相当苛刻，样品间的微小差异甚至是某个氨基酸的差异都可能导致晶体生长条件有很大的改变。两个产地蝎毒的对应组分能在完全相同的条件下获得晶型完全相同晶体，说明这些对应组分的分子结构很可能是相同的。

3.4 通过以上 4 个产地蝎毒的比较可以看出，不同产地的蝎毒之间从 Sephadex G-50，Sp-Sephadex C-25 柱层析行为直至电泳，毒性结果及结晶行为都有着很大的相似性。它们之间也存在着一定的差异，这些差异可能是由地区差异而引起，也可能是由于蝎子处于不同的生长期而引起：文献报道(Wolfgang，1971)，未成熟个体中含有酸性毒蛋白而成熟个体中则无，益都蝎毒采用剪尾法获得，难免混有未成熟个体，故淅川，常德蝎毒中未发现存在于益都蝎毒中的 pI5.3 的酸性组份；其差异还可能由于饲料不同而引起：益都蝎子为野生的，而其它 3 个产地蝎子为人工饲养的，它们的食物结构必有很大差别，可能引起毒素组分有所差异。总而言之，不同产地的蝎毒之间的共同点大于它们之间的差异。

参 考 文 献

王锦兰等，1985. 生物化学杂志，1(3)：29.

刘建宁，杨端，雷克健，1988. 东亚马氏钳蝎哺乳动物类神经毒素一级结构及分子进化的研究　科学通报，33(1)：79.

吉永华，徐科，1983. 马氏钳蝎的哺乳动物神经毒素的分离和纯化　生物化学与生物物理学报，15(6)：517.

郭尧君，1988. 薄层等电聚焦电泳技术．北京：中国生物物理学会．13—30.

郭尧君，1991. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展．生物化学与生物物理进展，18(1)：32.

胡纫秋，王森，刘建宁等，1989. 几种新的蝎毒神经毒素的纯化及它们某些性质和结构的初步研究．动物学研究，10(3)：185—193.

Righetti P G *et al*, 1978. *J. Chromatogr.* 157: 773.

Wolfgang B, 1971, Venomous animals and their venoms Ⅲ, 341.

Zell A, *et al*. 1985. Molecular Architecture of Proteins and Enzymes, Orlando Florida: Academic Press, INC, 65-97.

THE PURIFICATION AND COMPARISON OF CHINESE SCORPION NEUROTOXINS FROM DIFFERENT LOCATIONS

Liu Yanshun Wang Miao Jin Lei Li Hongmin Wang Dacheng

(*Institute of Biophysics, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100101)

Abstract

Several basic mammal neurotoxins and one crustacean neurotoxin were purified from Chinese scorpion (*Buthus martensi* Karsch) venoms which were collected in different areas of China including Provinces, Henan (Xichuan), Shangdong (Yidu), Hunan (Changde) and Sichuan (Chengdu). The procedures of purification involved in Sephadex G-50, Sp-Sephadex C-25 and IEF. The isoelectric points, molecular weights and toxicities of the obtained fractions were assayed and compared. The comparison indicated that the neurotoxins from different locations were very similar in respect to their liquid chromatographies, but also in respect to their isoelectric points, molecular weights, toxicities and crystallization. Despite some differences, it seemed that these neurotoxins from different locations widely distributed in China are corresponding each other.

Key words Scorpion Venom, Neurotoxin, Purification, Comparison